

Republic of Ecuador

👉 EDICT OF GOVERNMENT 👈

In order to promote public education and public safety, equal justice for all, a better informed citizenry, the rule of law, world trade and world peace, this legal document is hereby made available on a noncommercial basis, as it is the right of all humans to know and speak the laws that govern them.



NTE INEN 1500 (2011) (Spanish): Leche.
Métodos de ensayo cualitativos para la
determinación de la calidad

BLANK PAGE





INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1500:2011
Primera revisión

LECHE. MÉTODOS DE ENSAYO CUALITATIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD.

Primera Edición

MILK. METHODS OF QUALITATIVE TEST FOR QUALITY DETERMINATION.

First Edition

DESCRIPTORES: Alimentos, productos lácteos, leche, métodos de ensayo cualitativos para la determinación de la calidad.
AL 03.01-333
CDU: 637.133.4
CIU: 3112
ICS: 67.100.10

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	LECHE. MÉTODOS DE ENSAYO CUALITATIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD	NTE INEN 1500:2011 Primera revisión 2011-06
---	--	--

1. OBJETO

1.1 Esta norma establece los métodos de ensayo cualitativos para la determinación de la calidad de la leche.

2. ACIDEZ

2.1 Determinación de estabilidad proteica.

2.1.1 *Definición.* La estabilidad proteica es la propiedad que tiene la leche de no producir precipitación o coagulación de la proteína en presencia de una solución de alcohol etílico o de una solución alcohólica de alizarina, ó, por acción del calor, debido a la acidificación.

2.2 Método de la prueba de la leche con alcohol

2.2.1 *Fundamento.* El método consiste en añadir a la leche una cantidad de alcohol etílico neutro; si ésta ha sufrido acidificación o es anormal por contener calostro o provenir de vacas afectadas con mastitis, se forman coágulos y el ensayo se reporta como positivo.

2.2.2 Equipo

2.2.2.1 Tubos de ensayo con capacidad para 20 cm³

2.2.2.2 Pipetas graduadas de 5 cm³

2.2.2.3 Gradilla

2.2.3 *Reactivos.* Solución acuosa de alcohol etílico neutro de 68 % en peso o 75 % en volumen

2.2.4 *Procedimiento.* Transferir 5 cm³ de muestra a un tubo de ensayo y añadir 5 cm³ de la solución acuosa de alcohol etílico. Tapar el tubo y agitar invirtiéndolo dos o tres veces, observar su aspecto.

2.2.5 *Expresión de resultados.* Si no existe precipitación o formación de coágulos de la leche, reportar como negativa la prueba del alcohol y se dice que esta presenta estabilidad proteica.

2.3 Método de la prueba de la alizarina

2.3.1 *Fundamento.* El método consiste en añadir a la leche una cantidad de solución alcohólica de alizarina; si ésta ha sufrido acidificación se forman grumos gruesos y una coloración amarilla. Si no hay formación de grumos y se produce una coloración lila, indica la presencia de sustancias neutralizantes (leche alcalina).

2.3.2 Equipo

2.3.2.1 Tubos de ensayo con capacidad de 20 cm³

(Continúa)

DESCRIPTORES: Alimentos, productos lácteos, leche, métodos de ensayo cualitativos para la determinación de la calidad.

2.3.2.2 Pipetas graduadas de 5 cm³

2.3.2.3 Gradilla

2.3.3 *Reactivos*

2.3.3.1 *Alizarol*. Solución alcohólica de alizarina al 0,2 % m/v (en alcohol neutro al 75 % en volumen).

2.3.4 *Procedimiento*. Mezclar volúmenes iguales de leche y alizarol, agitar y observar el color y aspecto.

2.3.5 *Expresión de resultados*

2.3.5.1 Si se produce precipitación o formación de coágulos y una coloración amarilla de la leche, reportar como positiva la prueba de la alizarina y se dice que la leche posee una fuerte acidez y no presenta estabilidad proteica.

2.3.5.2 Si no presenta formación de coágulos y a su vez, presenta una coloración lila al morado intenso, según las concentraciones agregadas, se dice que la leche posee sustancias neutralizantes.

2.4 Prueba de ebullición

2.4.1 *Fundamento*. El método consiste en someter una muestra de leche a ebullición; si ésta ha sufrido acidificación se observará grumos o partículas coaguladas. Esta prueba es una alternativa de la prueba de alcohol, pero consume más tiempo en el análisis y es menos sensible.

2.4.2 *Equipo*

2.4.2.1 Tubos de ensayo con capacidad de 20 cm³

2.4.2.2 Pipetas graduadas de 5 cm³

2.4.2.3 Gradilla

2.4.2.4 Pinzas para tubo

2.4.2.5 Fuente de calor

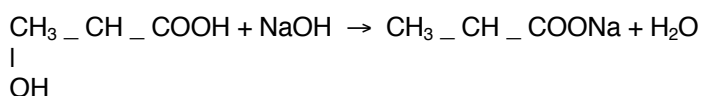
2.4.3 *Procedimiento*. Hervir agitando constantemente una muestra de 2 a 5 cm³ de leche en un tubo de ensayo.

2.4.4 *Expresión de resultados*. Si se observan grumos o formación de coágulos, reportar como positiva la prueba de ebullición. La leche no ácida no coagula por aplicación de calor, lo hace la leche ácida y los calostros.

3. NEUTRALIZANTES ALCALINOS

3.1 Definiciones. Son sustancias que tienen como finalidad neutralizar el ácido láctico desarrollado por la fermentación de la lactosa a través de microorganismos específicos. Dentro de estas sustancias están: orina bovina, carbonatos, hidróxido de sodio y jabones de mala calidad.

3.2 Fundamento. Las diversas sustancias indicadas en 3.1.1, neutralizan el ácido láctico a medida que éste se forma, ejemplo:



Ácido Láctico + Hidróxido de sodio → Lactato de sodio + agua

(Continúa)

3.3 Método de la prueba de la alizarina. Ver numeral 2.3

3.4 Método de la prueba del ácido rosólico (aurina)

3.4.1 Fundamento. El ácido rosólico es un indicador de pH que tiene un rango de viraje entre 6,8 a 8,0.

3.4.2 Equipo y materiales

3.4.2.1 Tubos de ensayo con capacidad de 20 cm³

3.4.2.2 Pipetas graduadas de 5 cm³

3.4.2.3 Gradilla

3.4.2.4 Embudo

3.4.2.5 Papel filtro

3.4.3 Reactivos

3.4.3.1 Alcohol etílico neutralizado

3.4.3.2 Solución de ácido rosólico en alcohol etílico neutralizado

3.4.4 Procedimiento

3.4.4.1 Pipetear en un tubo de ensayo 5 cm³ de leche, adicionar 5 cm³ de alcohol etílico neutralizado y homogenizar por inversión lentamente.

3.4.4.2 Filtrar la mezcla con papel filtro, recibiendo el filtrado en otro tubo de ensayo.

3.4.4.3 Agregar al filtrado, 2 a 3 gotas de ácido rosólico.

3.4.5 Expresión de resultados

3.4.5.1 En presencia de neutralizantes la reacción da una coloración rojo carmesí.

3.4.5.2 Preparar en un tubo de ensayo un blanco, usando en vez del filtrado el mismo volumen de alcohol etílico y el mismo número de gotas de ácido rosólico. Si la coloración de la muestra es más intensa que la del tubo con el blanco, reportar el resultado como positivo.

3.5 Identificación de orina en la leche mediante la prueba de "pupo"

3.5.1 Equipo

3.5.1.1 Tubos de ensayo con capacidad de 20 cm³

3.5.1.2 Pipetas graduadas de 10 cm³

3.5.1.3 Gradilla

3.5.2 Reactivos

3.5.2.1 Ácido clorhídrico ($\rho= 1,19$)

3.5.2.2 Etanol absoluto

3.5.2.3 Ácido nítrico ($\rho= 1,42$)

(Continúa)

3.5.3 Procedimiento. Pipetear en un tubo de ensayo 5 cm³ de leche, adicionar 5 cm³ de ácido clorhídrico, 5 cm³ de etanol absoluto y 5 cm³ de ácido nítrico.

3.5.4 Expresión de resultados. Si se observa una coloración rosado-violácea con fluorescencia azulada, indica la presencia de orina en la leche. Reportar el resultado como positivo.

3.6 Determinación de la adición de orina (método alternativo)

3.6.1 Fundamento. La leche en presencia de una solución alcohólica de timol y cloroformo presenta una coloración violeta cuando ha sido añadida orina.

3.6.2 Equipo

3.6.2.1 Embudo

3.6.2.2 Papel filtro

3.6.2.3 Vaso de precipitación

3.6.2.4 Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 cm³

3.6.3 Reactivos

3.6.3.1 Ácido tricloroacético al 20 %

3.6.3.2 Solución alcohólica de Timol al 5 %

3.6.3.3 Ácido clorhídrico concentrado que contenga 0,5 g de cloruro férrico por cada 100 cm³

3.6.3.4 Cloroformo al 37 %

3.6.4 Procedimiento. A 10 cm³ de leche añadir 5 cm³ de ácido tricloroacético al 20 % y filtrar, al filtrado añadir 1 cm³ de la solución alcohólica de Timol y 10 cm³ ácido clorhídrico concentrado. Dejar en reposo 20 minutos y añadir 2 cm³ de cloroformo y observar el color.

3.6.5 Expresión de resultados. La aparición de una coloración violeta en la capa clorofórmica, indica la presencia de orina en la leche, caso contrario permanece incolora.

4. CONSERVANTES

4.1 Identificación de formaldehído (prueba de hehner)

4.1.1 Equipo

4.1.1.1 Tubos de ensayo con capacidad de 20 cm³

4.1.1.2 Pipetas graduadas de 10 cm³

4.1.1.3 Gradilla

4.1.1.4 Fuente de calor

4.1.1.5 Gotero

4.1.2 Reactivos

4.1.2.1 Solución acuosa de cloruro férrico al 1 %, recién preparada

4.1.2.2 Ácido sulfúrico diluido (1 + 1) en volumen, $\rho = 1,820$ a $1,825$

(Continúa)

4.1.2.3 Solución diluida de formaldehído: diluir dos gotas de solución de formaldehído de 38 % a 40 % en 100 cm³ de agua.

4.1.3 Procedimiento. Pipetear en un tubo de ensayo 5 cm³ de leche previamente homogenizada, agregar 1 cm³ de ácido sulfúrico diluido y una gota de cloruro férrico. Mezclar y calentar a ebullición.

4.1.4 Expresión de resultados. Si se observa una coloración violeta en la interface entre el ácido y la leche, indica la presencia de formaldehído en la leche. Reportar el resultado como positivo.

4.2 Prueba de confirmación (formaldehído) (ver nota 1).

4.2.1 Fundamento. Se separa el formaldehído por destilación en medio ácido y el destilado se hace reaccionar con ácido cromotrópico, en caliente. La presencia de formaldehído está indicada por una coloración púrpura.

4.2.2 Equipo

4.2.2.1 Balón y equipo de destilación de Kjeldahl

4.2.2.2 Material de vidrio

4.2.2.3 Baño de agua con temperatura controlada

4.2.3 Reactivos

4.2.3.1 Ácido sulfúrico grado reactivo

4.2.3.2 Ácido fosfórico grado reactivo

4.2.3.3 Sal sódica del ácido cromotrópico C₁₀H₆O₈S₂Na₂·2H₂O: Disolver 500 mg de la sal sódica en 100 cm³ de una mezcla de 85 partes de ácido sulfúrico y 15 partes de agua.

4.2.4 Procedimiento

4.2.4.1 Colocar en un balón de Kjeldahl 100 cm³ de leche y 100 cm³ de agua. Agregar 5 cm³ de ácido fosfórico, se adapta la trampa de destilación y el refrigerante y se destila lentamente hasta obtener 50 cm³ de destilado.

4.2.4.2 En un tubo de ensayo colocar 5 cm³ de la solución de ácido cromotrópico, adicionar 1 cm³ de destilado, mezclar y colocar en un baño de María hirviendo por 15 minutos, observar el color durante el calentamiento.

4.2.5 Expresión de resultados. La presencia de formaldehído está indicada por la aparición de un color púrpura, cuya intensidad depende de la cantidad de formaldehído presente.

4.3 Identificación de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada)

4.3.1 Método de Arnold y Mentzer (óxido de Vanadio)

4.3.1.1 Fundamento. El óxido de vanadio en medio ácido sulfúrico reacciona con el agua oxigenada, dando un compuesto de coloración anaranjada (rosa salmón).

4.3.1.2 Equipo

a) Tubo de ensayo con capacidad de 20 cm³

b) Pipetas graduadas de 5 y 10 cm³

NOTA: Cuando la concentración del formaldehído en la leche es alta, la prueba es menos sensible por lo que se recomienda hacer diluciones de la muestra con leche libre de formaldehído.

(Continúa)

4.3.1.3 Reactivos. Solución de pentóxido de vanadio al 1 % (m/v) (V_2O_5) en ácido sulfúrico diluido, preparado agregando cuidadosamente 6 cm³ de ácido sulfúrico concentrado (del 95 % al 98 %) a 94 cm³ de agua

4.3.1.4 Procedimiento

- a) Pipetear en el tubo de ensayo 10 cm³ de leche, agregar 10 gotas de la solución de óxido de vanadio y agitar.
- b) Al mismo tiempo trabajar con un testigo negativo (leche fresca y pura) y con un positivo (leche pura adicionada de unas gotas de agua oxigenada).

4.3.1.5 Expresión de resultados. Si se observa una coloración anaranjada (rosa salmón), indica la presencia de peróxido de hidrógeno. Reportar el resultado como positivo. Una coloración amarillenta, igual al reactivo, debe considerarse como negativa.

4.3.2 Método del Ácido Clorhídrico y formol

4.3.2.1 Fundamento. El ácido clorhídrico con el formol reacciona con el agua oxigenada, dando una coloración violeta azulada.

4.3.2.2 Equipo

- a) Tubos de ensayo con capacidad de 25 cm³
- b) Pipetas graduadas de 1 y 10 cm³
- c) Fuente de calor

4.3.2.3 Reactivos

- a) Ácido clorhídrico concentrado.
- b) Solución de formol al 1 %

4.3.2.4 Procedimiento. Pipetear en el tubo de ensayo 10 cm³ de leche, agregar 10 cm³ de ácido clorhídrico y una gota de formol al 1 %, agitar y calentar hasta desprendimiento de vapores.

4.3.2.5 Expresión de resultados. Si se observa una coloración violeta azulada, indica la presencia de peróxido de hidrógeno. Reportar el resultado como positivo.

4.3.3 Método del yoduro de potasio

4.3.3.1 Fundamento. La catalasa natural de la leche destruye el H_2O_2 añadido. El yoduro de potasio reacciona con el peróxido de hidrógeno dando una coloración amarillo canario.

4.3.3.2 Equipo

- a) Tubos de ensayo con capacidad de 25 cm³
- b) Pipetas graduadas de 1 y 10 cm³

4.3.3.3 Reactivo. Solución de yoduro de potasio al 35 %, recién preparada.

4.3.3.4 Procedimiento. Pipetear en el tubo de ensayo 5 cm³ de leche y agregar unas gotas de la solución de yoduro de potasio.

4.3.3.5 Expresión de resultados. Si se observa una coloración amarillo canario, indica la presencia de peróxido de hidrógeno. Reportar el resultado como positivo.

(Continúa)

4.4 Identificación de cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro

4.4.1 Método del yoduro de potasio

4.4.1.1 Fundamento. El método se fundamenta en la formación de yodo libre a partir del yoduro de potasio, por la acción del cloro libre o hipocloritos.

4.4.1.2 Equipo

- a) Tubo de ensayo con capacidad de 20 cm³
- b) Pipetas graduadas de 1 y 5 cm³
- c) Baño de agua con temperatura controlada

4.4.1.3 Reactivos

- a) Solución de yoduro de potasio al 7,5 %, recién preparada
- b) Ácido acético
- c) Solución de almidón al 1 %

4.4.1.4 Procedimiento. Pipetear en un tubo de ensayo 5 cm³ de leche y agregar 0,5 cm³ de la solución de yoduro de potasio al 7,5 %, agitar. Observar la coloración del medio.

4.4.1.5 Expresión de resultados

- a) Si se observa una coloración amarilla, indica la presencia de cloro libre. Para confirmar se añade 1 cm³ de la solución de almidón al 1 %, deberá desarrollarse una coloración azul violeta. Si no se presenta cambio en la coloración, adicionar 4 cm³ de ácido acético, colocar en baño de María a 80 °C por 10 minutos (no sobrepasar los 80 °C), enfriar en agua corriente y observar la coloración de la cuajada. En presencia de hipoclorito ésta deberá ser amarilla. Para confirmar adicionar 1 cm³ de la solución de almidón al 1 %, deberá desarrollarse una coloración azul violeta. Reportar el resultado como positivo.
- b) Hacer una prueba en blanco con ácido clorhídrico.

4.5 Método alternativo para la identificación cloro, hipocloritos, cloraminas y dióxido de cloro.

4.5.1 Equipo

4.5.1.1 Material de vidrio

4.5.1.2 Baño de agua con temperatura controlada

4.5.2 Reactivos

4.5.2.1 Solución de yoduro de potasio. Disolver 7,5 g de yoduro de potasio en 100 cm³ de agua destilada. Preparar cuando se vaya a usar.

4.5.2.2 Ácido clorhídrico diluido. A 100 cm³ de ácido clorhídrico (36,5 a 38,5 %), agregar 200 cm³ de agua destilada.

4.5.2.3 Solución de almidón. Hervir un gramo de almidón soluble en 100 cm³ de agua destilada. Enfriar antes de usar.

4.5.3 Procedimiento.

4.5.3.1 Prueba I. Pipetear 5 cm³ de leche en un tubo de ensayo, agregar 1,5 cm³ de solución de yoduro de potasio, mezclar bien por agitación. Anotar el color de la leche.

(Continúa)

4.5.3.2 Prueba II. Si no cambia el color de la leche, agregar 4 cm³ de ácido clorhídrico diluido, mezclar bien con una varilla de vidrio de extremo plano y observar el color de la cuajada.

4.5.3.3 Prueba III. Colocar luego el tubo en el baño de María calentado previamente a 85 °C y dejar en reposo 10 minutos, (durante este tiempo la cuajada sube a la superficie), enfriar rápidamente colocando el tubo en agua fría. Anotar el color de la cuajada y el líquido.

4.5.3.4 Prueba IV. Agregar luego al líquido por debajo de la cuajada 0,5 a 1 cm³ de la solución de almidón. Observar el color inmediatamente. Determinar la concentración de cloro disponible según la tabla siguiente.

TABLA DE REACCIONES DE LAS DISTINTAS PRUEBAS

Prueba	Concentración de cloro disponible					
	1000 mg	500 mg	200 mg	100 mg	40 mg	20 mg
Prueba I	Pardo amarillo	Amarillo intenso	Amarillo pálido difuso	-	-	-
Prueba II	Pardo amarillo	Amarillo intenso	Amarillo claro	-	-	-
Prueba III	Pardo amarillo	Amarillo intenso	Amarillo	Amarillo	Amarillo pálido	Amarillento
Prueba IV	Azul violáceo	Azul violáceo	Azul violáceo	Rojo violáceo oscuro	Rojo violáceo	Rojo violáceo pálido

5. ADULTERANTES

5.1 Definición. Se considera que la leche ha sido adulterada cuando se ha añadido espesantes como productos feculentos (harina o almidones, claro de maíz, etc.), soluciones azucaradas o soluciones salinas, etc., con el propósito de mantener la densidad en los rangos señalados, cuando se agrega agua y así evitar su rápida detección.

5.2 Detección de almidón

5.2.1 Fundamento. El almidón con el yodo libre forma un compuesto de absorción de coloración azulada.

5.2.2 Equipo

5.2.2.1 Tubos de ensayo de 20 cm³

5.2.2.2 Pipetas graduadas de 1 y 10 cm³

5.2.2.3 Baño de agua con temperatura controlada

5.2.3 Reactivos. Solución lugol o tintura de yodo

5.2.4 Procedimiento. Pipetear en un tubo de ensayo 10 cm³ de leche, calentar hasta ebullición en el baño de María hirviendo y mantener el calentamiento por 5 min. Enfriar en agua corriente y adicionar 5 gotas de la solución de lugol o tintura de yodo.

5.2.5 Expresión de los resultados. Si se observa una coloración azul, indica la presencia de almidón o harina. Reportar el resultado como positivo.

5.3 Identificación de harina y almidones (método alternativo)

5.3.1 Equipo

5.3.1.1 Fuente de calor

5.3.1.2 Recipiente con agua-hielo

(Continúa)

5.3.2 Reactivos

5.3.2.1 Solución de yoduro de potasio (yodo 1 g y yoduro de potasio 2 g)

5.3.2.2 Agua destilada 300 cm³

5.3.3 Procedimiento

5.3.3.1 Pipetear en un tubo de ensayo 5 cm³ de leche, calentar hasta ebullición, enfriar en el agua con hielo y agregar 5 gotas del reactivo.

5.3.3.2 Preparar un testigo negativo con leche pura fresca y un testigo positivo con la misma leche adicionada de almidón.

5.3.4 Expresión de resultados

5.3.4.1 Positivo: Una coloración azul indica la presencia de almidón o harina.

5.3.4.2 Negativo: Color amarillento

5.3.4.3 El color azul debe desaparecer por calentamiento.

5.4 Detección de sacarosa

5.4.1 Equipo

5.4.1.1 Tubos de ensayo con capacidad de 20 cm³

5.4.1.2 Probeta graduada de 10 cm³

5.4.1.3 Baño de agua caliente con temperatura controlada

5.4.2 Reactivos

5.4.2.1 Solución acuosa de bilis de buey, preparada así: 2 gramos de bilis de buey desecada para bacteriología, disuelta en 100 cm³ de agua destilada

5.4.2.2 Ácido clorhídrico fumante del 37 %, grado analítico, $\rho = 1,19$.

5.4.3 Procedimiento

5.4.3.1 En un tubo de ensayo colocar 4 gotas de leche, 4 gotas de la solución de bilis de buey y 3 cm³ de ácido clorhídrico. Mezclar y colocar en el baño de agua a 50 °C exactamente durante 5 min.

5.4.3.2 Preparar un testigo negativo con leche cruda, fresca y pura.

5.4.3.3 Preparar un testigo positivo con la misma leche anterior a la que se adiciona sacarosa en una proporción de 0,2 %.

5.4.4 *Expresión de resultados.* Si se observa una coloración rojo violeta, indica la presencia de sacarosa. Reportar el resultado como positivo. La aparición de un color rojo tenue se considera negativa.

5.5 Colorantes. Los colorantes como el achiote (bixa Orellana) y anilinas son adicionados a la leche descremada o aguada para restablecer el color normal de la leche.

5.5.1 Equipo

5.5.1.1 Tubos de ensayo

5.5.1.2 Pipetas graduadas de 2 cm³

(Continúa)

5.5.2 Reactivos

5.5.2.1 Éter etílico

5.5.3 Procedimiento. Mezclar partes iguales de leche y éter, dejar en reposo y observar.

5.5.4 Expresión de resultados. Si se ha adicionado achiote, el éter depositado en la superficie resulta teñido. Cuando se ha añadido anilina, el coágulo sin grasa por la extracción con el éter tiene color anaranjado.

5.6 Identificación de colorantes (Método alternativo)

5.6.1 Fundamento. Se investiga la presencia de colorantes en el precipitado obtenido, al adicionar ácido acético a la leche tibia.

5.6.2 Equipo

5.6.2.1 Material de vidrio

5.6.2.2 Cápsula de porcelana

5.6.3 Reactivos

5.6.3.1 Ácido acético diluido (1 + 3)

5.6.3.2 Éter etílico

5.6.3.3 Solución de hidróxido de sodio al 2 %

5.6.3.4 Solución de cloruro estannoso al 40 %

5.6.3.5 Ácido clorhídrico concentrado

5.6.4 Procedimiento

5.6.4.1 Colocar aproximadamente 150 cm³ de leche en un vaso de precipitación y calentar a unos 50 °C; adicionar 5 cm³ de ácido acético (1 + 3) y continuar calentando lentamente, agitando hasta cerca del punto de ebullición, procurando aglutinar el precipitado en una sola masa, con ayuda de un agitador. Separar el líquido utilizando un tamiz o un dispositivo similar, prensar el precipitado para separar el líquido residual y transferir a un erlenmeyer pequeño. Adicionar 50 cm³ de éter etílico, tapar y dejar en reposo por varias horas, agitando por intervalos regulares. Decantar el éter en un vaso de precipitación o en una cápsula, evaporar con las precauciones del caso y en el residuo investigar colorantes.

5.6.4.2 Para comprobar la presencia de achote (annato), proceder de la siguiente manera.

5.6.4.3 Tomar una porción del residuo y calentar con la solución de hidróxido de sodio al 2 %. Con esta solución impregnar una tira de papel filtro. Si el achote está presente, el papel absorbe color y cuando se lava cuidadosamente con agua, permanece coloreado. Dejar secar, agregar una gota de la solución de cloruro estannoso al 40 % y secar. Si la coloración se torna púrpura, se confirma la presencia de achiote.

5.6.4.4 Si después de extraer con éter el precipitado de la leche, ésta todavía presenta coloración amarillenta o anaranjada, nítida, debe sospecharse la presencia de un colorante sintético. para la identificación de colorantes sintéticos, seguir métodos convencionales conocidos.

(Continúa)

5.7 Grasas vegetales. Identificación de grasas vegetales en la leche y productos lácteos, por el método Cromatografía de gases con extracción hidrolítica

5.7.1 Resumen. La grasa y los ácidos grasos de los alimentos se extraen por método hidrolítico (hidrólisis ácida en la mayoría de los productos, hidrólisis alcalina para productos lácteos y una combinación de ambos para el queso). El ácido pirogálico se adiciona para reducir la degradación oxidativa de los ácidos grasos durante el análisis. Como estándar interno se adiciona Triglicéridos y Triundecanoico ($C_{11:0}$). La grasa se extrae con éter, luego se metilan los ácidos grasos a esteres metílicos (FAMES) usando BF_3 en metanol. Los FAMES se miden cuantitativamente por cromatografía de gases (GC) contra el estándar interno $C_{11:0}$. La grasa total se calcula como la suma de ácidos grasos individuales expresada como su triglicérido equivalente. La grasa monosaturada e insaturada se calculan como la suma de sus respectivos ácidos grasos. La grasa moniinsaturada incluye solamente a la forma *cis*.

5.7.2 Equipo

5.7.2.1 Cromatógrafo de gases. Con detector de hidrógeno para ionización de llama, columna capilar, inyector modo separado; horno programado para implementar una secuencia en la rampa de retención. Condiciones de operación: temperatura ($^{\circ}C$) inyector 225; detector 285; temperatura inicial 100 (espera 4 min), rampa $3^{\circ}C/min$; temperatura final 240; espera 15 min. Gas: helio; velocidad del flujo: $0,75ml/min$; velocidad lineal: $18 cm/s$; relación 200:1

5.7.2.2 Columna capilar. Capaz de separar los dos esteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) adyacentes al pico $C_{18:3}$ y $C_{20:1}$ y los tres FAMES adyacentes a los picos $C_{20:1}$, $C_{20:3}$ y $C_{20:4}$, con una resolución de 1,0 o mayor. (SP2560 100 m x 0,25 mm con 0,20 μm de diámetro interno).

5.7.2.3 Matraces Mojonnier

5.7.2.4 Tapones – de caucho sintético o corcho

5.7.2.5 Canastas de centrifuga para los balones Majonnier

5.7.2.6 Gránulos de ebullición

5.7.2.7 Cestas de aluminio o plástico

5.7.2.8 Baño de agua con agitador – para mantener una temperatura de 70° - $80^{\circ}C$

5.7.2.9 Baño de vapor – con soporte para material de vidrio

5.7.2.10 Baño de agua – con suministro de corriente de nitrógeno, que mantenga la temperatura a $40^{\circ} \pm 5^{\circ}C$

5.7.2.11 Agitador – diseñado para las cestas de matraces majonnier

5.7.2.12 Centrifuga Majonnier impulsado con motor (opcional), que mantenga 600 rpm

5.7.2.13 Estufa – que mantenga una temperatura $100^{\circ} \pm 2^{\circ}C$

5.7.2.14 Mezcladores Vortex

5.7.2.15 Tubos de dispersión de gases – de 25 mm, porosidad “A” 175 μm de diámetro

5.7.2.16 Viales de tres copas – de 11 ml

5.7.2.17 Tapas fenólicas – con filo de polivinil para los viales

5.7.2.18 Septas de teflón/silicona – para ajustar los viales

(Continúa)

5.7.3 Reactivos y materiales

5.7.3.1 Ácido pirogálico

5.7.3.2 Ácido chorhídrico – 12 M y 8,3 M: adicionar 250 ml de HCl 12 M a 110 ml de H₂O, mezclar bien y almacenar a temperatura ambiente (20°C a 25 °C)

5.7.3.3 Hidróxido de amonio – 58 % (m/m)

5.7.3.4 Dietil éter – de pureza adecuada para la extracción de grasa

5.7.3.5 Éter de petróleo – anhidro

5.7.3.6 Etanol – 95 % (v/v)

5.7.3.7 Tolueno – Nanogrado

5.7.3.8 Cloroformo

5.7.3.9 Sulfato de sodio – Anhidro

5.7.3.10 Trifluoruro de boro – 7 % BF₃ (m/m) en metanol, prepararla a partir de la forma comercialmente disponible solución al 14 % de BF₃. Preparar en campana extrartora.

5.7.3.11 Mezcla de dietil éter – éter de petróleo – 1 + 1 (v/v)

5.7.3.12 Solución de estándar interno de triglicéridos – C_{11:0} triundecanoico 5,00 mg/ml en CHCl₃: Pesar con precisión 2,50 g de C_{11:0} triundecanoico en un frasco volumétrico de 500 ml. Adicionar cerca de 400 ml de CHCl₃ y mezclar hasta disolver. Llevar a volumen con CHCl₃. Invertir el frasco por lo menos 10 veces. La solución interna de triglicéridos es estable por un mes guardada en refrigeración (2° - 8°C).

5.7.3.13 Soluciones estándar de metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) –

- Mezcla de solución estándar de FAMES: La mezcla de referencia contienen la serie de FAMES incluido el C_{18:1} *cis* y *trans* (disponible como GLC-85 de Un Chek Prep, Elysian, NM 56028, USA o equivalente). Para preparar la mezcla de soluciones estándar de FAMES: romper la tapa del vial, abrir y cuidadosamente transferir el contenido al vial de tres copas. Lavar el vial original con hexano para asegurar la completa transferencia y adicionar el líquido de lavado al vial de tres copas. Diluir a 3 ml con hexano
- Solución estándar FAME C_{11:0} – metil éster undecanoico en hexano. Usar solamente para la preparación de soluciones estándar individuales de FAME (ver c)). Para preparar la solución estándar FAME de C_{11:0} romper la tapa del vial, abrir y cuidadosamente transferir en contenido a un balón volumétrico de 50 ml. Lavar el vial original con hexano para asegurar la completa transferencia y adicionar el líquido de lavado al balón volumétrico de 50 ml. Aforar con hexano. Esta solución es estable por una semana almacenada a 0°C.
- Soluciones estándar FAME individuales – Soluciones estándar de cada uno de los siguientes FAMES: C_{4:0} Tetraanoico metil éster; C_{6:0} hexanoico metil éster; C_{8:0} Octanoico metil éster; C_{10:0} decanoico metil éster; C_{12:0} dodecanoico metil éster; C_{13:0} tridecanoico metil éster; C_{14:0} tetradecanoico metil éster; C_{14:1-9}-tetradecenoico metil éster; C_{15:0} pentadecanoico metil éster; C_{15:1-10}-pentadecenoico metil éster; C_{16:0} hexadecanoico metil éster; C_{16:1-9}-hexadecenoico metil éster; C_{17:0} heptadecanoico metil éster; C_{17:1-10}-heptadecenoico metil éster; C_{18:0} Octadecanoico metil éster; C_{18:1-9}-octadecenoico metil éster; C_{18:2-9,12}-octadecenoico metil éster; C_{18:1-9, 12,15}-octadecatrienoico metil éster; C_{20:0} eicosanoico metil éster; C_{20:1-8}- eicosenoico metil éster; C_{20:2-11,14}-eicosadienoico metil éster; C_{20:3-11,14,17}-eicosatrienoico metil éster y C_{22:0} docosanoico metil éster. Preparar las soluciones estándares FAME individuales como sigue: Romper la tapa del vial, abrir y transferir el contenido cuidadosamente al vial de tres copas. Lavar el vial original con hexano para asegurar la completa transferencia y adicionar el líquido de lavado al vial de tres copas. Adicionar 1,0 ml de la solución estándar FAME C_{11:0} (ver b)), y diluir a 3 ml con hexano. Estas soluciones son estables una semana guardadas en refrigeración (2° - 8°C).

(Continúa)

5.7.3.14 Muestra patrón de leche o producto lácteo sin adición de grasas vegetales

5.7.4 Preparación de la muestra

5.7.4.1 Extracción de la grasa

- a) *Productos lácteos.* Pesar con precisión una porción de muestra que contenga entre 100 – 200 mg de grasa dentro del matraz Majonnier. Adicionar 100 mg de ácido pirogálico, y 2,00 ml de la solución de estándar interno. Adicionar unos pocos granulos de ebullición al matraz. Adicionar 2,0 ml de etanol y mezclar bien hasta que toda la porción del ensayo esté disuelta. Adicionar 4,0 ml de H₂O y mezclar bien. Adicionar 2,0 ml de NH₄OH y mezclar bien. Colocar el matraz dentro de la canasta en el baño de agua a 70°-80°C con agitación moderada durante 1 0 min. Mezclar el contenido del matraz usando un mezclador Vortex cada cinco minutos, para incorporar las partículas adheridas a los lados del matraz dentro de la solución. Luego de la digestión retirar el matraz del baño de agua y adicionar unas pocas gotas de fenoltaleína. Mantener la solución básica (rosada) con la adición de hidróxido de amonio. Adicionar suficiente etanol para llenar el reservorio del matraz y mezclar bien.
- b) *Extracción.* Adicionar 25 ml de dietil éter al matraz Mojannier. Tapar el matraz y colocarlo en la canasta de la centrífuga. Poner la canasta en el agitador, asegurando el matraz con la tapa de goma. Agitar por 5 min. Enjuagar la tapa dentro del matraz con la mezcla de dietil éter-éter de petróleo. Adicionar 25 ml de éter de petróleo, tapar el matraz y agitar 5 min más. Centrifugar por 5 min a 600 rpm. (Nota: si no se dispone de centrífuga, dejar en reposo al menos una hora hasta que se separen las capas). Enjuagar la tapa dentro del matraz con la mezcla de dietil éter-éter de petróleo. Decantar la capa de éter en un vaso de 150 ml y cuidadosamente enjuagar la boca del matraz dentro del vaso con la mezcla de dietil éter-éter de petróleo. Evaporar lentamente el éter en el baño de vapor, usando una corriente de nitrógeno para ayudar la evaporación. El residuo en el vaso contiene la grasa extraída.

5.7.4.2 Metilación. Disolver el residuo de la grasa extraída en 2-3 ml de cloroformo y adicionar 2-3 ml de dietil éter. Transferir la mezcla al vial de vidrio y evaporar a sequedad en un baño de agua a 40°C con corriente de nitrógeno. Adicionar 2,0 ml de BF₃ al 7%, y 1,0 ml de tolueno. Tapar el vial con una tapa rosca que contenga septas de teflón/silicona. Calentar el vial en estufa a 100°C por 45 min. Cada 10 min agitar suavemente el vial (Nota: la evaporación del líquido de los viales indica un tapado inadecuado; si esto ocurre, descartar la solución y repetir el procedimiento completo). Dejar que el vial adquiera temperatura ambiente (20°- 25°C). Adicionar 5,0 ml de H₂O, 1,0 ml de hexano y 1,0 g de Na₂SO₄. Tapar el vial y agitar 1 min. Dejar en reposo para que las capas se separen y cuidadosamente transferir la capa superior a otro vial que contenga 1,0 g de Na₂SO₄. (Nota: la capa superior contiene los FAMES incluido el FAME de la solución de estándar interno de triglicéridos.). Inyectar los FAMES dentro de la columna o transferir a un inyector automático para el análisis de cromatografía.

5.7.5 Procedimiento

5.7.5.1 Determinación cromatográfica. Los tiempos de retención relativos (vs FAMES de la solución de estándar interno de triglicéridos) y los factores de respuesta de los FAMES individuales pueden obtenerse por análisis de Cromatografía de gases de las soluciones estándar de FAMES individuales y de la solución estándar de la mezcla de FAME. Inyectar 2 µl de casa solución estándar de FAME individual y 2 µl de la solución estándar de la mezcla de FAME. Usar la solución estándar de la mezcla de FAMES para optimizar la respuesta cromatográfica antes de inyectar las soluciones de ensayo. Luego que todas las condiciones cromatográficas se han optimizado inyectar la solución de ensayo (ver 4.1.4.2)

5.7.6 Interpretación de resultados. Se considera ausencia o negativo de presencia de grasas vegetales cuando el cromatograma de la muestra es similar al cromatograma de la muestra de leche o productos lácteos sin adición de grasa vegetal.

(Continúa)

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Esta norma no requiere de otras para su aplicación.

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Métodos de ensayo presentados por miembros del Subcomité técnico de *Leche y productos lácteos*. Quito, 1999.

AOAC Método oficial 996.06 *Grasa (total, saturada e insaturada) en alimentos Método Cromatografía de gases con extracción hidrolítica*. AOAC 2005

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1500 **TÍTULO:** LECHE. MÉTODOS DE ENSAYO CUALITATIVOS **Código:** AL 03.01-333
Primera revisión PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo 2002-10-22 Oficialización con el Carácter de VOLUNTARIA por Acuerdo No. 02 498 del 2002-12-26 publicado en el Registro Oficial No. 739 del 2003-01-07 Fecha de iniciación del estudio: 2010-11
---	--

Fechas de consulta pública: de a

Subcomité Técnico: Leche y Productos Lácteos
Fecha de iniciación: 2011-12-09
Integrantes del Subcomité Técnico:

Fecha de aprobación: 2011-01-20

NOMBRES:

Dr. Rafael Vizcarra
Ing. Julio Gutiérrez
Ing. Juan Carlos Romero
Dra. Teresa Rodríguez
Dra. Indira Delgado
Dra. Mónica Sosa
Dr. Alexander Salazar
Ing. Paola Simbaña
Ing. Noela Bautista

Tlga. Tatiana Gallegos
Ing. Gustavo Navarro
Sr. Rodrigo Gómez de la Torre
Ing. Leonardo Baño
Ing. Julio Vera
Dr. Galo Izurieta
Ing. Lourdes Reinoso
Ing. Daniel Tenorio
Ing. Luis Sánchez

Ing. Rocío Contero
Dr. David Villegas
Dra. Katya Yépez
Dr. Darío Solórzano
Dr. Paúl Fuertes
Dr. Rodrigo Dueñas
Dra. Cecilia Zamora
Dra. Ma. Isabel Salazar
Ing. Jorge Chávez
Dra. Verónica Iñiguez
Ing. Santiago Tinajero
Ing. Franklin Hernández
Ing. Fernando Párraga
Ing. Ángel Oleas
Dr. Marlon Revelo
Tlgo. Ernesto Toalombo
Dra. Ana María Hidalgo
Dr. Antonio Camacho
Ing. César Guzmán
Ing. María E. Dávalos (Secretaria Técnico)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

Centro de la industria láctea, CIL-ECUADOR
UTA - FACULTAD DE ALIMENTOS
LACTEOS SAN ANTONIO
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, Guayaquil
ALPINA ECUADOR S.A.
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, Quito
REYBANPAC – LACTEOS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA -
ECOLAC
MINISTERIO DE SALUD – SISTEMA ALIMENTOS
HOLSTEIN
PRODUCTORES DE LECHE
AVELINA S.A.
LA HOLANDESA
PATEURIZADORA QUITO
SFG – MAGAP
AILACCEP
DIRECCIÓN PROVINCIAL DE SALUD DE
PICHINCHA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
MIPRO
NESTLÉ ECUADOR
NESTLÉ ECUADOR
BUSTAMANTE & BUSTAMANTE
REYBANPAC
INDUSTRIAS LÁCTEAS TONI S.A.
INDUSTRIAS LÁCTEAS TONI S.A.
MAGAP
ALIMEC S.A.
MAGAP
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
PROLAC
PROLAC
PASTEURIZADORA QUITO
EL SALINERITO
LABORATORIO OSP – UNIVERSIDAD CENTRAL
ACA FOOD SAFETY
ASAMBLEA NACIONAL
INEN

Otros trámites: Esta NTE INEN 1 500:2011 (Primera Revisión), reemplaza a la NTE INEN 1 500:2003

La Subsecretaría de Industrias, Productividad e Innovación Tecnológica del Ministerio de Industrias y Productividad aprobó este proyecto de norma en sesión de

Oficializada como: Voluntaria Por Resolución No. 11 139 de 2011-05-20
Registro Oficial No. 481 de 2011-06-30

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gov.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inenlaboratorios@inen.gov.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gov.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec
URL: www.inen.gov.ec**